

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-125900

(P2000-125900A)

(43) 公開日 平成12年5月9日 (2000.5.9)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード* (参考)

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A 2 G 0 4 5

G 0 1 N 33/50

Z N A

G 0 1 N 33/50

Z N A P 4 B 0 2 4

// C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願平10-301316

(22) 出願日

平成10年10月22日 (1998.10.22)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 金城 政孝

北海道札幌市北区北23条西13丁目南新川10-404

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

最終頁に続く

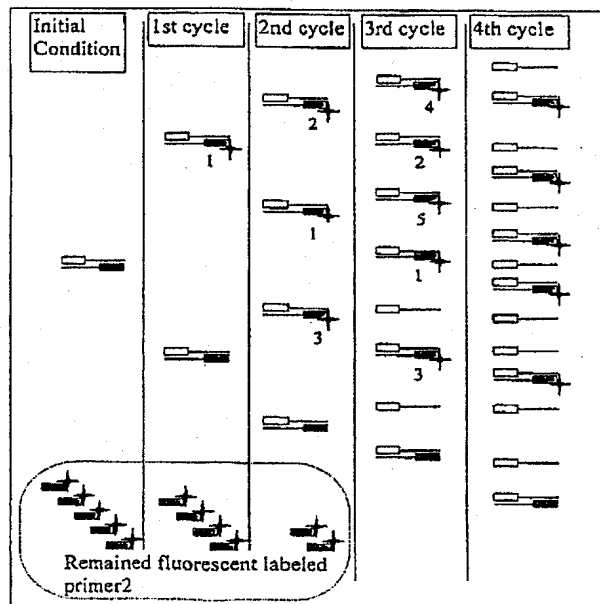
(54) 【発明の名称】 標的核酸の定量分析方法

(57) 【要約】

(修正有)

【課題】 Bound / Free 分離が不要でありながら、定量性の高い核酸配列の増幅反応を用いた標的核酸分子の検出方法を提供する。

【解決手段】 非標識の第1プライマと蛍光標識された第2プライマとを、第1プライマよりも第2プライマが少ない混合数で試料含有液と混合して、適度な回数のPCRを行い、フォーカシングされたレーザー光線による3次元的な微小視野内にて個々の蛍光分子の挙動に依存した複数時点での測定データを得、これら測定データを位置的变化に応じた統計学的データに変換し、この統計学的データに基づいて試料中に含有する標的核酸分子の個数を決定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中に存在する標的核酸分子を定量的に分析する方法において、標的核酸分子の離れた2つの塩基配列領域に対してそれぞれ相補的である塩基配列を有する第1および第2のプライマ分子と標的核酸分子を含む生物学的試料とを含んだ混合液を核酸増幅が達成されるようにハイブリダイゼーション反応が可能な状態に維持する増幅工程、ここで、いずれか一方のプライマは追跡可能な標識分子で標識されており、少なくとも標識されたプライマの混合数は既知である、少なくとも1回の増幅工程を実行した上記混合液の少なくとも一部を用いて、標識分子に関する測定データを得る測定工程、上記想定データに基づいて標的核酸分子の分子数あるいは分子サイズを決定する決定工程、とを有することを特徴とする標的核酸の定量分析方法。

【請求項2】 増幅工程は、非対称な核酸増幅が達成されるように選ばれた第1および第2プライマの混合比率において実行されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 標識分子で標識したプライマの混合数は、他方のプライマよりも少ないことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 2種類のプライマの混合比率が、1:0.5であることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 測定工程が、個々の標識分子を識別し得る程度の微小視野内において経過時間内での複数の測定データを得る工程と、上記複数の測定データを時間的な位置変化を表現する統計学的データに変換する工程と、統計学的データに基づいて標的核酸分子の個数を決定する決定工程と、を含んでいることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】 統計学的データが、自己相関関数を用いて演算される工程を含むことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである請求項6に記載の方法。

【請求項8】 決定工程が、統計学的データをプロットすることで得られる標識分子の動的変化の曲線に基づいて実行されることを特徴とする請求項1~7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 測定工程が、3次元の微小視野内において実行される請求項5に記載の方法。

【請求項10】 測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 回折限定が平均直径 $30 \pm 20 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】 回折限定が平均直径 $20 \pm 10 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項14】 微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{nm}$ の略円柱状領域であることを特徴とする請求項9~13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 標識分子が蛍光色素を有していることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項16】 蛍光色素が、ハイブリダイゼーション反応により標的核酸とのハイブリッド体に取り込まれたときに蛍光特性が変化するものであることを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項17】 蛍光色素が、ローダミン、アクリジンオレンジ、チアゾールイエロー、オキサゾールイエローから選ばれることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】 測定工程が、単一フォトンを計測するための測定モードにより実行されることを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項19】 増幅工程が、標的核酸分子の量に応じたサイクル数にて実行することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中に存在する核酸分子を検出する技術に関し、特に、核酸増幅反応を用いて標的核酸分子を特異的に検出する方法に関する。本発明は、単一の核酸分子に関する測定データが得られるような検出方法に適用される。従って、本発明は、標的核酸分子の個数に関係した情報を得る任意の目的に、有効に適用できる。

【0002】

【従来の技術】 DNAやRNAなどの核酸の検出と分子量の測定は、生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段である。また、最近では、遺伝子診断や遺伝子治療においても重要な分析手段となっている。例えば、遺伝子増幅法として非常に重要なPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法においては、その増幅した遺伝子の最終的な検出は、ゲル電気泳動法を用い、鎖長（分子量）毎の分画に分離した後に、特定位置の分画の有無を測定している。

【0003】 DNAポリメラーゼは、複製を開始するためのプライマと、複製時のタンパク源としての四種類のDNA基質（dATP、dGTP、dTTP、dCTP）が存在する時、一本鎖DNAを鋳型（template DNA）にして、相補鎖を合成して二本鎖（dsDNA）を形成することが知られている。ここで、基質の一部に蛍光分子で標識したヌクレオチドであるRhodamine-dUTP（Rhodamine-dUTPと略す）を

加えておくと、これも一緒に取込まれて、蛍光標識されたdsDNAを合成することができる(Voss, H.ら, Meth. Mol. Cell Biol., 3, 30-34, 1994)。

【0004】PCR法は、通常2種類のプライマ(第1プライマ、第2プライマ)を用いるので、これら第1および第2プライマが等量ではないとき、少ない方のプライマがPCRサイクル中に消費し終わると、以後のPCRサイクルでは、一本鎖のDNA(ssDNA)が毎回生成される。このように、PCR用の一對のプライマの個数比率が1対1でない場合に展開されるDNA増幅過程を、非対称PCR(asymmetric PCR)と呼ぶ。非対称PCRによって得られたssDNAは、塩基配列を決定するために有効に利用できる。

【0005】PCR法において、増幅されたdsDNAの総量は、適宜の容器中またはプレート上の検液全体が放つ蛍光総量として蛍光計測計により測定される。こうして測定された蛍光総量は、十分に増幅された後の標的DNAに相当する。しかし、PCRにおける増幅反応は、相反する温度条件下での反応過程、即ち、dsDNAを二本の分かれたssDNAに分離するように変性させるために高温下に試料を置く昇温段階と、ssDNAを上述した1対のプライマとハイブリダイズさせるために温度を下げる降温段階とを含んでいるので、増幅の様子を定量的に追跡することは困難である。従って、従来のPCR法では、標的核酸の増幅中または増幅前の総量を定量的に解析することは不可能であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述した核酸検出方法の実態に鑑み、標的核酸分子の存在量を正確に定量する検出方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、PCR法における増幅反応を定量的に測定できる方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、少ないコピー数でも定量できる核酸分子の検出方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、微量の試料でも標的核酸分子の有無を検出できる方法を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、PCRにおける増幅過程を分子レベルで知ることができる、核酸分子の測定方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段および作用効果】本発明は、試料中に存在する標的核酸分子を検出する方法において、少なくとも1塩基以上の標的核酸分子に相補的である第1および第2のプライマ分子を、核酸分子を含む生物学的試料と混合する工程、ここで、第1プライマ分子は第2プライマ分子よりも少ない混合比率であり、少なくとも第1プライマ分子は測定可能な標識分子により標識されている、標的核酸分子と第1、第2プライマとを、核酸増幅が達成されるようにハイブリダイゼーシ

ョン反応が可能な状態に維持する増幅工程、増幅工程中の混合液を、標識分子の時間的な位置変化を得るように微小視野において顕微鏡的に測定する工程、複数の測定データを時間変化のばらつきに応じた統計学的データに変換する工程、統計学的データに基づいてハイブリダイゼーション反応の反応曲線を得る工程、ここで、反応曲線の立ち上がりの高さが核酸分子の個数を表している、を有していることを特徴とする核酸配列の増幅反応を用いた標的核酸の検出方法である。

【0008】本発明では、第1のプライマおよび第2のプライマの混合比率は、等量でないで、非対称PCRが行われる。非対称PCRの結果は、PCRにおける定量的な反応解析を実現するという画期的な作用効果をもたらす。従って、本発明の方法によれば、PCRの増幅途中または増幅前の標的核酸分子を高精度に検出することができる。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明で実施される非対称PCRは、第2のプライマの分量を第1のプライマよりも少なく設定しするとともに、第2のプライマが光学的に測定可能な標識分子で標識されていることが重要である。この第1および第2のプライマの分量は、少なくとも1回の増幅反応が、過剰な標識分子の下で標的核酸分子とハイブリダイズするように下限値を設定するのが好ましい。また、図1において本発明に係わる非対称PCRの概念図のように、第2のプライマの数量(図1では、1個の標的核酸分子に対して5個の第2プライマおよび過剰量の第1プライマからなる混合比率で混合した場合)は、非対称PCRにおけるハイブリダイズ反応の許容回数を決定する要素となる。

【0010】非対称PCRによる増幅反応サイクルは、標的核酸を多量に含む試料でさえ、1回以上の増幅が、第2プライマが不足することなく、完全に実行される必要がある。本発明の方法は、標的核酸が少量でも検出できるので、試料含有液を少なくすることで、第2プライマのさらなる節約が可能となる。第2プライマに要求される数量は、PCRに付す試料中において自然条件で出現し得る最大量の標的核酸分子について、1回以上のPCRを完了できるように統計的に決定すればよい。従って、同量の第2プライマを用いて、種々の数量の標的核酸分子との増幅反応を実行すると、試料中に標的核酸分子が少量であればあるほど、許容回数に達するまで、即ち、第2プライマが完全に消費されるまで、PCRサイクルを繰り返す必要が有る。従って、第2のプライマの数量は、測定に付された試料中にたった1個の標的核酸が存在する場合でも、適当な回数のPCRサイクルで第1プライマが消費されるように、設定するのが好ましい。図1からも判るように、第2プライマの数量と試料含有液中の標的核酸の数量とは、非対称PCRにおいて増幅反応が飽和状態(プラトー)に達するまでに要する

時間もしくはPCRサイクル数に影響する。

【0011】有効回数のPCRサイクルを経た試料含有の混合液の少なくとも一部は、定量的に分取されるか容器その他に収容されたまま、適宜の測定に付す。ここで、測定手法は、増幅に伴う標識分子の大きさ変化に関する測定を行うものであれば、適宜選択してよく、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、蛍光計測用フローサイトメータ、イメージサイトメータ、蛍光顕微鏡等が有効に利用できる。測定工程が、3次元の微小視野内において実行されることにより、標識分子の試料含有液の中における自由な微小運動を、PCR反応の結果に応じた自然状態のままで高精度に測定できる。これに対して、2次元的な視野内で測定すると、ブラウン運動のように、標識分子の3次元的に自由な移動をもれなく捕らえることができないので、測定精度が低い。微小視野を形成するに当たっては、ハロゲンランプからの光を収束させたり極微小の平均半径からなるアパーチャーまたはピンホールに通すことによって得ることもできるが、レーザ光線による収束光を利用するのが好ましい。

【0012】測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成されることにより、被写界深度の深い測定データが得られるので、個々の任意の標識分子が視野内で常に合焦して正確な位置および出力データを測定手段に供給することができる。

【0013】微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることにより、個々の標識分子を高いS/N比で測定できる。

【0014】回折限定が平均直径 $1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることにより、少数の選ばれた標識分子からの測定データを効率良く得ることができる。

【0015】微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{ nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{ nm}$ の略円柱状領域であることにより、測定視野内に照準された標識分子に関する自由な微小運動を効率良く取得することができる。

【0016】本発明では、微小の測定視野内を出入りする標識分子の運動速度を、所定空間内において1以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消出を指標として測定している。従って、第2のプライマを標識する標識分子の種類は、複数の測定時点において、ほぼ一定の出力を維持するような標識材料であるのが好ましい。このような標識分子の材料としては、発光性物質、蛍光性物質、磁性物質、放射性物質その他が挙げられる。特に、発光性物質と蛍光物質は、長時間、発光または蛍光を発するような色素を選ぶのが好ましい。標識分子として、発光色素や蛍光色素を有するものを使用すれば、光学的に容易な構成で分子レベルの測定を実行できる。蛍光色素の中では、特に、核酸分子同士の相補的な結合の際に、その相補的な結合部分にインターカレートすることによって遊離時とは蛍光特性が変化するも

のであればよい。インターカレートに伴い蛍光特性が変化する蛍光色素としては、アクリジンオレンジ、チアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー、ローダミンが挙げられる。

【0017】測定工程が、蛍光分子の位置変化を測定する場合には、フォトマルチプライヤやフォトダイオード等の蛍光測定手段により蛍光データを受光することができる。蛍光測定手段は、単一フォトン計測し得るような測定モードを備えている方が、蛍光分子に関する個別の測定を行うのに有利である。

【0018】測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである場合には、本発明を更に有効な実施形態とすることができ、個々の標識分子の微小運動を正確に測定することができる。ゆらぎ運動の測定を行うに当たっては、自己相関関数 (Autocorrelation function) を用いて演算するのが好ましい。特に、標識分子として、蛍光を用いる場合には、自己相関蛍光分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy、略してFCS) を採用するのが好ましい。FCSを用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応においてFCSを利用した報告 (Kinjo, M., Rigler, R., Nucleic Acids Research, 23, 1795-1799, 1995) を参照することができる。

【0019】FCSを用いたPCRの定量の可能性は、発明者自身が、等量の2種のプライマを用いた場合において、複製のタンパク源としての塩基であるdUTPに蛍光分子を標識して、PCRを行った所、少ないPCRサイクルでも標的核酸分子の検出が可能となることを発見した。しかし、この発見した方法は、蛍光測定の前に、標的核酸分子に結合しなかった蛍光分子を除去する工程が必要であった。そこで、発明者は、PCR法により、未結合の標識分子を除去することなく、標的核酸分子を定量できる新たな方法をさらに突き止めた。

【0020】FCSを実施する装置の概略は、図2に示す。このFCS装置は、共焦点光学系を用いた倒立型の蛍光顕微鏡1と試料からの蛍光を測定するためのフォトマルチプライヤ2と測定データを受信して自己相関関数による演算を行って数値化またはグラフ化を行うデータ処理装置3と、演算結果を画面上に表示する表示装置4とを備えている。

【0021】試料含有液11は、図2に示す通り、試料台12に載せたスライドガラス13上に点着させることで、簡単にセットできる。この装置では、特に、微量の試料含有液11を用いるため、水分の蒸発を防止するための蓋14をスライドガラス13上にかぶせてある。この蓋14は、好ましくは、光透過性となるべく低いものを用いることで、気密性と遮光性を同時に得られる。但

し、蓋の内面は、励起光線の反射を防止するように、できるだけ光反射性の低いものを使用するのが好ましい。試料含有液11が位置するスライドガラス13部分の真下には、試料含有液11中で焦点を結ぶように設定した対物レンズ15が配置している。なお、蛍光顕微鏡1は、落射型でもよい。落射型においては、対物レンズ15のレンズ下面に直接的に試料含有液11を点着してもよい。また、蛍光顕微鏡1の光源であるレーザ発生装置16は、図2ではアルゴン(Ar)イオンレーザーを使用しているが、蛍光の種類に応じて、クリプトンアルゴン(Kr-Ar)イオンレーザー、ヘリウムネオン(He-Ne)レーザー、ヘリウムカドニウム(He-Cd)レーザー等に種々変更して構わない。また、蛍光顕微鏡1におけるスライドガラス13の搬入や搬出、スライドガラス13等への試料含有液の点着、蓋14の開閉等の各種動作は、必要に応じて適宜自動化してもよい。

【0022】図3は、図2の蛍光顕微鏡1の測定部分を示す拡大図である。図3(A)において、スライドガラス13と所定の開口数(図では $NA=1.2$)の対物レンズ15との位置関係により、微小視野領域20が形成される。この微小視野領域20は、図3(B)に示すように、実際には、ボリウムを持ったレーザ光線の焦点(図では中間のくびれた部分)から上下に伸びた略円柱状の視野を有している。この視野領域20は、焦点を基準位置として、光軸上の長さZと平均半径Wにより規定される。このような、微小領域20における蛍光測定は、蛍光分子の微小運動を追跡し得る最小限の領域にまで小さくすることにより、試料含有液11中の焦点付近以外の蛍光分子に由来するノイズを有効に除去し、1個の蛍光分子を正確に測定するのに寄与している。

【0023】本発明は、上述した種々の実施の形態に基づき、遺伝病診断、親子鑑定、犯罪調査、遺伝子治療、分子生物学的研究、医薬品開発等に応用可能である。上述した実施の形態についても、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、変更可能な発明を包含する。例えば、上述した実施の形態では、測定装置として、蛍光顕微鏡の試料台にて、顕微鏡観察時と同じ環境下で測定可能なものを説明したが、欧州公開特許第640828A1号に開示している装置を改良し、サーマルサイクラーの内部の試料含有液に対して、対物レンズから出射するレーザ光をフォーカシング可能となるように光学的に設計すれば、試料含有液をスライドガラス上に移すことなく、増幅反応を連続的に測定できる。また、PCRサイクルにおける経過時間内の複数データの取り方は、所定サイクル後の一定時間内に継続的または断続的に複数得る場合と、異なるサイクル毎に適当数の測定データを得る場合の何れもあり得る。

【0024】以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されることなく、発明の主旨に基づいて、本発明の出願時の技術水準に応じて自明な

範囲における種々の変更が可能である。

【0025】

【実施例】Rho-プライマによる500bp DNAの増幅量及びFCS測定で算定した蛍光分子の総数

(1) 非対称PCRの実施

プライマの準備とPCR用の混合液の調製

2種類の非標識のプライマ(プライマ1; 5'-GATGAGTTCTGTGTCCTACAACTGG-3'、プライマ2; 5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGC-3'、北海道システムサイエンス製)と、これらプライマを蛍光分子であるローダミンで標識した2種類のプライマ(Rho-プライマ1、Rho-プライマ2、宝酒造(株)製)および鋳型(template) DNAとしての全長ラムダ・ファージDNA(48.5 kbp、 3.2×10^7 Da、1 bp = 660 Da)を表1に示すような組合せと濃度により、2.5 UのポリメラーゼAmpliTaq Gold™ (PE Applied Biosystems製)および0.2 mMのdNTPとともに、10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1.5 mMのMgCl₂、0.001%ゼラチン、pH 8.3の緩衝液25 μ L中に混和した。鋳型(テンプレート)の濃度は、1 ng/25 μ L ~ 0.1 fg/25 μ Lの間で変えた。それは、 $1.9 \times 10^7 \sim 1.9 \times 10^1$ 分子/25 μ Lに相当する。

【0026】PCRによる増幅反応の実施

上記鋳型DNAの500 bpの塩基配列に関するPCR反応は、プログラム可能なサーマルコントローラーであるModel PC-700 (アステック社製)を使用し、まず、96℃で15分間の事前の変性工程用のプレインキュベーションを行った後に、55℃で1分間のアニリング工程、72℃で2分間の伸長工程および96℃で1分間の変性工程というPCRサイクルを50回のサイクル数で実行した。

【0027】(2) FCSによる増幅反応結果の測定
測定用の混合液の測定

50サイクルの増幅反応の後に、適当量(10 μ L)の混合試料液を、カバーガラスLab-Tek (商標)

(Nalge, Nunc社製)上にピペッティングにより点着し、共焦点光学系を有する倒立型のFCS装置であるConfoCor (商標) (Carl Zeiss製)の試料台にセットした。倍率40倍、開口数1.2を有する対物レンズC-Apocromat (商標)

(Carl Zeiss製)をカバーガラス上の試料含有液に対してフォーカシングするようにした。アルゴンレーザーの励起光を用いた測定期間中(1分間)の試料含有液からの蒸発を防ぐために、カバーガラス上に点着した試料含有液の液滴上にさらに同様のカバーガラスを載せた上で、蛍光測定を室温にて実行した。なお、このFCS装置における微小視野としての検出領域の体積を、

標準サンプルとしてローダミン6Gを用いた拡散時間の測定によって定義付けしたところ、検出領域の長さに対する径の比Sは、約5.2であり、体積要素は計算により 1×10^{-15} Lであった。FCS測定した後に、試料混合液をアガロースゲル電気泳動により、分画を確認した。

【0028】測定データの統計学的データへの変換

焦点上のレーザービームの強度分布はガウシアン分布であるが、蛍光観測領域は準円筒形状で表した。それゆえ、サンプル液中に焦点を結んだレーザービームは非常に小さい円筒形状の場を形成し、その中に蛍光粒子がブラウン運動で出入りしている。その微小領域における蛍光粒子の数の変動により引き起こされた蛍光強度の変動がモニター出来る。蛍光強度の変動は自己相関関数を用いて解析され、焦点領域内の分子の平均数と並進拡散時間が求められた。蛍光自己相関関数 $G(t)$ は、蛍光分子の平均数(N)、フリープライマの並進拡散時間(τ

free)及び伸長プライマ(τ_{poly})を用い、式1により単純な2成分モデルで近似させた(Rigler, R.ら, Fluorescence Spectroscopy, 13-24, In J. R. Lakowicz (Ed.), 1992参照)。なお、 $\tau_{free, poly} = w_0^{2/3} D_{free, poly}$ 及び $S = w_0 / z_0$ 、ここでyは伸長プライマの割合、 w_0 は検出領域の径(体積要素)、 z_0 は領域長、 D_{free} 及び D_{poly} はそれぞれフリーと伸長プライマの並進拡散定数である。体積要素における拡散時間は、拡散定数に関係している。FCSによるデータ解析は、非線形最少二乗法を用い、「FCS」と言うコンピュータプログラム(EVOTEC BioSystems社、で行った。

【0029】

【表1】

| Primer concentration | | | y | N | Total |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------|------|-----|-------|
| Primer1 (nM) (Rho-primer1)* | Primer2 (nM) (Rho-primer2)* | Primer ratio | | | |
| 800 | 400* | 1:0.5 | 0.30 | 900 | 120 |
| 800 | 40* | 1:0.05 | 0.60 | 90 | 24 |
| 800 | 4* | 1:0.005 | 0.52 | 8 | 2.1 |
| 400* | 800 | 0.5:1 | 0.35 | 863 | 140 |
| 40* | 80 | 0.05:1 | 0.21 | 76 | 8.4 |
| 4* | 800 | 0.005:1 | ND | 9 | ND |

【0030】

【数1】

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left\{ \frac{1-y}{1 + \frac{t}{\tau_{free}}} \sqrt{\frac{1}{1 + S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{free}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1 + \frac{t}{\tau_{poly}}} \sqrt{\frac{1}{1 + S^2 \cdot \frac{t}{\tau_{poly}}}} \right\}$$

【0031】表1において、フィット曲線では、 τ_{free} (0.17ms)と τ_{poly} (1.98ms)は自由なパラメータを減らすために、固定してある。なお、表1において、aは、増幅されたローダミン標識プライマーの産生量、bは、焦点領域に於ける蛍光分子の平均数、cは、総産生量(総産生量は蛍光標識プライマーの初期濃度とローダミン標識プライマーの増幅産生量(y)から計算した)、dは、ローダミン標識プライマーの濃度、eは、Non-Detected(検出出来ず)を意味する。

【0032】表1の結果は、非対称PCRにおけるプライマ・セットの最適比を決定するために行った予備実験の結果である。6通りのプライマ比、即ち、1ngの鋳型の存在下に、プライマ1:Rho-プライマに対して3通り(800nM:400nM、40nM:800nM、4nM:800nM)、そして、Rho-プライマ1:プライマ2(400nM:800nM、40nM:800nM、4nM:800nM)、をテストした。50サイクルのPCRの後、10 μ Lの反応液がカバーガラスの上にセットされ、1分間FCSで測定した。図4は典型的な蛍光自己相関関数を示す。Rhoプライマ2

($\tau_{free} = 0.164$ ms)の並進拡散時間はサーマルサイクルを受けていない対象サンプルから定義した(図4の丸印)。

【0033】PCR50サイクル後、プライマ1:Rhoプライマ2(400nM:800nM)の条件下における、フリーRhoプライマ(図4の丸印でプロットした曲線)と、非対称PCR産物の自己相関関数。曲線は式1でフィットして得られた。そして、フリーRhoプライマ $\tau_{free} = 0.164$ msの並進拡散時間、及び増幅されたDNAの並進拡散時間と増幅産物の収率をそれぞれ $\tau_{poly} = 1.98$ 、 $y = 0.6$ として、式1に与えた。もう一つの対象サンプル(酵素を除いて、サーマルサイクルはかけてある)もまた測定された。ここではデータは示していないが、結果は0.169msであった。500bpDNA(PCRプロダクト)の並進拡散時間は自己相関曲線から計算され、 $\tau_{poly} = 1.98$ msであった(図4の四角印でプロットした曲線)。この値はロッド様分子の並進拡散定数の理論計算によると、500bp長のDNAと一致した。このように、増幅産物は自己相関関数における変化からよく決定することが出来た。フリープライマと増幅プライマの並

進拡散時間の違いから、増幅産物の割合を定量することが出来た。

【0034】この解析では、 τ_{poly} , τ_{free} 及び S がフィッティングで固定され、自由なパラメーターの数を減らし、フリーと伸長したパラメーター (y) の比を明確にした。フリープライマと産物はサーマルサイクルの後でも、物理的に分離されていないけれども、この解析により、産物の量を測定することが可能であった (表1)。プライマ1: Rhoプライマ2が800 nM: 400 nMの場合には、残ったフリープライマとPCR産物の比 ($y=0.6$) は他よりも良かった。800 nM: 400 nMのプライマー比では、500 bpの総生産量は他のプライマ比の場合よりも良かった。しかしながら、フリープライマのほぼ70%がまだ残っていた。プライマ比が800 nM: 4 nMでは、Rhoプライマ2の全部がPCR産物に組み込まれることが予想されていたけれど、ラベルされたプライマ2の約半分だけが組み込まれ、産物の生産量は800 nM: 40 nMの比の場合よりも良くはなかった。逆に、Rhoプライマ1: プライマ2が、4000 nM: 800 nM、40 nM: 800 nM、4 nM: 800 nM、の場合では、PCR産物の生産量は0.35以下であった。この理由については、詳細なハイブリダイゼーションの動力学的な検討により明かに出来るであろう。

【0035】図5は、増幅標的産物、500 bp、はFCSによる定量測定の後、アガロースゲル電気泳動により解析した結果を示したものである。すなわち、異なるプライマー比における非対称PCR産物のアガロース電気泳動による特性解析50サイクル後の非対称PCR液 (3 μ L) を1.4%アガロースゲルに添加した。図5 (A) は、エチジウムブロマイド染色をしない場合、図5 (B) は、エチジウムブロマイド染色した場合である。レーン1: HaeIIIで消化した Φ X174マーカ、レーン2: プライマ1: Rhoプライマ2比 800 nM: 400 nM、レーン3: プライマ1: Rhoプライマ2比 800 nM: 40 nM、レーン4: プライマ1: Rhoプライマ2比 800 nM: 4 nM、レーン5: Rhoプライマ1: プライマ2比 400 nM: 800 nM、レーン6: Rhoプライマ1: プライマ2比 40 nM: 800 nM、レーン7: Rhoプライマ1: プライマ2比 4 nM: 800 nM、レーン8: コントロール (通常プライマ使用PCR)、レーン9: コントロール (Rhoプライマ2)、コントロール (Rhoプライマ1とRhoプライマ2によるPCR)、500 bpとRhoプライマ2の位置は矢印で示した。500 bpとRhoプライマの間のかすかな太いバンドはプロモフェノール色素である。

【0036】500 bpのローダミン蛍光バンドはすべての場合において、エチジウム染色なしに検出出来た (図5 (A))。PCR産物もまた電気泳動後エチジウ

ム染色によって確認出来た (図5 (B))。500 bpのssDNA (single stranded) はゲルでは明瞭ではなかった。理由はssDNAの蛍光強度はこの染色方法ではdsDNA (double stranded) のそれよりも弱いからである。Rhoプライマ1: プライマ2比が40 nM: 800 nM及び4 nM: 800 nMの場合には、スミアーと非特異的バンドがゲル内に検出された (図5、レーン5-7)。逆に、プライマ1: Rhoプライマ2比が800 nM: 400 nM、800 nM: 40 nM、800 nM: 4 nMの場合には、500 bpバンドは明瞭に検出出来た。また、その強度は比が1: 0.05から1: 0.005に変化するにつれ減少した (図5、レーン2-4)。これらの結果は、FCS測定結果 (表1) と良く一致した。プライマ1: Rhoプライマ2比が800 nM: 40 nMがこのあとの実験に使用された。理由は500 bpの産生量 ($y=0.6$) が他の比の場合よりも多かったからである。FCSをベースとしたFA-PCR検出法は定量的正確性と簡便性と言う長所を有している。たった10 μ Lの反応液量で、FA-PCR後、1分間のFCS測定で目標遺伝子を検出出来る。もしも少数の鋳型遺伝子コピーがFA-PCR出来、FCSで測定出来たら、大変に興味深いものである。

【0037】図6は、本発明の上記方法の感度を調べる為に、25 μ Lの反応液中におけるPCR前の初期鋳型濃度を 1.9×10^7 から 1.9 分子の間で変化させた結果である (1.9×10^7 は白抜き逆三角印、 1.9×10^6 は黒三角印、 1.9×10^5 は白抜き丸印、 1.9×10^4 は黒四角印、 1.9×10^3 は白抜き菱形印、 1.9×10^2 は白抜き三角印、 1.9 は黒丸印で示した)。Rhoプライマ2の自己相関関数 $G(t)$ は、50サーマルサイクル後の鋳型数の増加に比例して長い相関時間の方向 (図6の右方向) に移行した。これは伸長したRhoプライマ2の増加に相当している。産生量及びFA-PCR産物の数は式1によって計算した。

【0038】光計測領域における蛍光分子の平均数は、図7に示した。標識DNA分子の数への影響は特になかったので、反応容器表面やガラスへの特異的あるいは非特異的吸着はこの実験では検出出来なかった。図8は、初期鋳型濃度に対する5000 bpの収率 (%) を示すようにしたグラフであり、25 μ L中 10^2 から 10^4 分子までの範囲では、PCR産物の産生量が鋳型DNA分子の初期個数に依存し相関していたので、その範囲は定量測定範囲として使用出来る。初期量として25 μ L中に190の鋳型分子が存在している場合でも、増幅DNAの相関値の減少曲線は分離出来、明瞭に検出出来た。 10^5 以上の鋳型分子の場合、50サイクル後にはブラトー効果が観察された。いくつかの要因がこのブラトー効果に寄与しているが、この効果はサイクル数と単純に相関していた。それ故、初期鋳型分子が高濃度であるよ

うな領域の測定については、サーマルサイクル数を減らすことによって、定量測定範囲を最適化することが出来る。

【0039】発明者が、行った実験においては、PCRの反応条件を最適化するにつれて、20個の鋳型DNA分子が試料中に存在する場合でも、検出できる所まで、突き止めた。PCRその他の反応条件をさらに最適化すれば、5個以内の鋳型DNAの検出レベルにまで設計することは、容易と考えられる。このような実験結果の示す傾向は、本発明の方法が、原理的には、たった1分子の鋳型DNAが存在する場合でさえ検出可能であるということを示唆している。

【0040】図9は、異なるPCRサイクル数のそれぞれについて、反応のための混合液25 μ L中の初期鋳型数とPCR産物の収率(%)を示したものである。この結果によれば、例えば、初期鋳型数が 10^6 以上の多量の場合には20サイクルまたはそれ以下のサイクル数、 $10^4 \sim 10^6$ の範囲では30サイクル、 $10^2 \sim 10^4$ の範囲では40サイクル、 10^3 以下では50サイクルまたはそれ以上のサイクル数の非対称PCRが、標的DNAの定量に利用可能であると認められる。特に、初期鋳型数が高濃度の場合には、PCRサイクル数を減らすことによって、定量可能範囲が最適化されるといえる。このように、定量可能なサイクル数におけるデータが得られれば、サイクル数を選る(例えば乗算する)ことにより、初期鋳型数を決定することができる。

【0041】図10は、図9の測定データを、開始時の鋳型DNA数毎に振り分けた時の、PCRサイクル数に対するPCR生産量を示すグラフである。この結果からは、初期鋳型数が 2×10^3 存在していれば、明確に定量できるということが分かった。また、図9のデータを考慮すると、 2×10^3 存在していても定量可能と推測できる。

【0042】FCSを用いた標的遺伝子の検出は、最近いくつか報告されている。NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)がFCSと結合され、血清中のHIV(Human Immunodeficiency Virus)の診断に有効な検出法であることが分かった(Oehlschlager, F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 12811-12816, 1996)。このNASBA法は、PCRの変法であるが、T7 RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、及びRNase Hと言う、3つの酵素の存在下で、2つのプライマと、プローブとして蛍光標識した別途のプライマとを必要とする。より簡単な方法(FCSによる増幅プローブ伸長検出法、APEX(Amplified Probe Extension)が同じグループから報告されている(Walter, N. G. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1280

5-12810, 1996)。それでも、順方向(forward)プライマと逆方向(reverse)プライマ・セットの他に、プローブとして蛍光標識した別途のプライマを必要とする。このAPEXの実験では、自己相関関数の時間的変移が26サイクル後に観測される。

【0043】発明者は、それら従来のPCR技法におけるFCS法の感度を高める為に、PCRにおいて蛍光モノヌクレオチドを用いる蛍光ランダム標識法を開発した。そして増幅20サイクル後に目標遺伝子の定量が出来た(Kinjo, M, Anal. Chim. Acta, 365, 43-48, 1998)。この開発した方法により、やや少数回の増幅サイクル数がランダム標識法に用いられたが、スピнкаラムを用いてPCR産物から取込まれなかった蛍光単分子を物理的に分離する、いわゆるBound/Free分離も必要とされた。逆に、ここに述べたFCSに基づいたFA-PCR検出法は、ゲル濾過法のような物理的分離法を用いることなく、反応条件下で蛍光標識したプライマのみを必要とするだけである。

【0044】蛍光エネルギー転移解析のような蛍光クエンチングに基づいたPCR定量法が以前に報告されている(Heid, C. A. ら, Genome Res., 6, 986-994, 1996, Livak, K. J., PCR Method Appl., 4, 357-362, 1995)。この技法は市販されているが、第1、第2のPCRプライマ・ペアーの他に、前節で述べたNASBA法とかAPEX法と同じく、一つのプローブ・シーケンスの中に2種類の色素を含んでいる。プローブのオリゴ塩基設計にあたっては、プライマの塩基配列と競合しない塩基配列を考えるだけでなく、融解温度(T_m)も考慮する必要がある。しかも、ドナーとアクセプター色素の位置も蛍光強度の増加効率及びポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性に影響する。もう一つのゆらぎ分光法(蛍光クロスコリレーション分光法)が均一溶液中における特定目標遺伝子の検出法として報告されている(Castro, A. ら, Anal. Chem., 69, 3915-3920, 1997)。クロスコリレーション法では非常に低濃度の目標配列を検出出来るけれど、この方法は依然として、実験溶液中では2種類の蛍光プローブを必要とする。

【0045】簡便性の観点からは、FCSに基づいたPCR定量法はエネルギー転移法およびクロスコリレーション法に比べて、重要な利点を有する。PCRの再現性と感度は、酵素のタイプ(Pol Iタイプ或いはタイプ)、プライマ配列、及び反応条件に強く依存する。一度これらの条件が決定されると、FCSに基づいたFA-PCRはプライマ比をわずかに変えるだけで、通常のPCRアッセイにすぐに応用出来る。それ故、ルーチンのPCR条件はFA-PCRの条件に容易に変更出来

る。しかも、RT-PCR (逆転写PCR) のような他の増幅方法も、この方法に変更することが出来、将来的には一個の細胞中のmRNAを定量することも出来る。

【0046】ゲル電気泳動及びカラムクロマトグラフィーではPCR産物はプライマと副産物から分離される。しかしながら、目標産物は電気泳動とゲル物質からの抽出課程で希釈され、さらにヌクレアーゼと接触する機会もあり、変成することもある。逆にFCSでは測定後のサンプル回収に便利であり、それはサンプル液滴はカバーガラスの上に置くだけであり、FCSは非侵襲性であるため、PCR溶液は希釈されることがなく、測定中に変成することもない。ゲル電気泳動の分解能は高く、1塩基の長さの違いを検出出来るが通常1時間程度の泳動時間を要するのに対して、FCSは非常な高速測定であり(実施例では1分間)、例えば臨床検査やスクリーニング検査のような大量検体検査では利点がある。FCS検査後のサンプルは直ちにゲル電気泳動等で詳細に解析出来、FCS測定結果を確認したり、塩基配列を解析したり出来る。かつまた、回収されたサンプルは後に続く実験に使用することが出来る。たとえば、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることが出来る。もしも、FCS測定後に増幅サンプルを回収する必要がなければ、キャリーオーバーによる汚染の危険性もなく廃棄出来る。というのは、FCSは非接触型の測定法だからである。

【0047】FCSは非侵襲性であり、直接測定を可能にするので、PCRサンプル量はFCSが必要とする測定量で決まる。発明者による今回の測定は10 μ Lのサンプル量で行ったが、理論的には10⁻¹⁵Lの体積要素レベルまで減らすことが出来る。しかし、PCR量は1 μ Lまで減らすことが出来れば、他の方法と比べて、経済面で大きな利点と言える。かつまた、FCSは蛍光顕微鏡を基礎としており、検出領域を対物レンズ上におくことが出来るため、in-situ PCRによる特定のRNAやDNAの定量に用いることが出来る。

【0048】発明者は、PCR溶液の解析に2成分モデルを使用して、良好な結果を得た。しかし、他の実験では多くのDNA種が存在するかもしれない。そのような場合には、DNAの種は従来のゲル電気泳動法で良く分離出来る。観測されたFCSデータのモデル関数からの相関曲線の違いから溶液中に分布する他の成分の存在が示唆することができるが、単純な2成分モデルはそのような場合は限界があると思われる。その結果、もっと詳細な定量解析が必要とされる場合は、CONTIVN (Max-Planck Institute製) のようなコンピュータプログラムを用いて、分布関数を得る多成分FCS解析法の開発が必要である。

【0049】本発明の方法は物理的分離方法を用いることもなく、非侵襲的、非接触のであり、使用するサンプル量も少ない。このような少量のサンプルの物理的取り

扱いは毛细管を使用したり、薄いカバーガラスや、フィルムをかぶせたガラス表面上の小さな穴を用いて行うことが出来、リアルタイム解析に用いることも出来る。これらの特性とさらなる改良により、増幅課程のモニターは容易に(リアルタイムモニタリング)、自動検出システム(ロボティックス)も可能であることは明白である。我々はFCSに基づいたFA-PCR定量法は感度、定量精度、簡便性において利点を有すると結論する。この方法は迅速スクリーニングのみならず、分子診断の新時代を開くものと期待している。

【0050】

【発明の効果】本発明によれば、プライマに標識分子を標識してPCRによる増幅反応を行うとともに、微小視野内で測定するようにして個々の標識分子の位置的变化を統計学的に解析したので、試料中の標的核酸の存在量を正確に定量的に検出できる。また、Bound/Free分離を行うことなく、定量分析できるので、取り扱いが簡単であり、自動化にも適している。また、少量の第2プライマに対して標識分子を結合させて用いるので、経済的にも有利である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明に係わる非対称PCRの概念図。

【図2】図2は、本発明の方法を実施するための装置の一例を示す概略図。

【図3】図3は、図2の装置の一部拡大図。

【図4】図4は、典型的な蛍光自己相関関数を示すグラフ。

【図5】図5は、増幅標的産物、500bp、はFCSによる定量測定の後、アガロースゲル電気泳動により解析した結果を示す図。

【図6】図6は、本発明の方法の感度を調べる為に、25 μ Lの反応液中におけるPCR前の初期鋳型濃度を1.9 $\times 10^7$ から1.9分子の間で変化させた場合のそれぞれの蛍光自己相関関数を示すグラフ。

【図7】図7は、図6で行った初期鋳型濃度毎の測定時の光計測領域(微小視野)における蛍光分子の平均数。

【図8】図8は、初期鋳型濃度に対する5000bpの収率(%)を示すようにしたグラフ。

【図9】図9は、異なるPCRサイクル数のそれぞれについて、混合液25 μ L中の初期鋳型数とPCR産物の収率(%)を示したグラフ。

【図10】図10は、図9の測定データを、開始時の鋳型DNA数毎に振り分けた時の、PCRサイクル数に対するPCR生産量を示すグラフ。

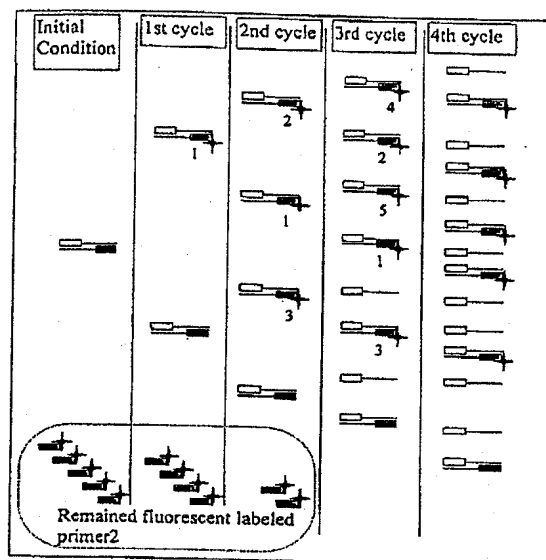
【符号の説明】

- 1…蛍光顕微鏡、
- 2…フォトマルチプライヤ、
- 3…データ処理装置、
- 4…表示装置、

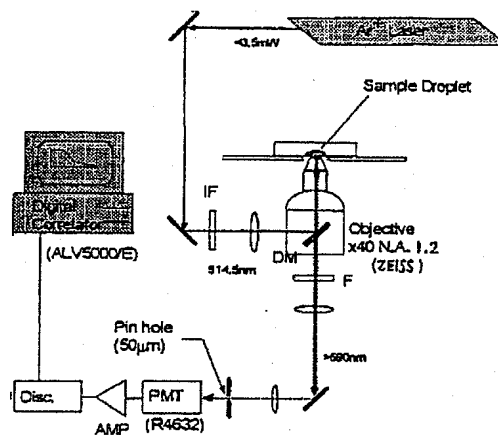
- 1 1 …試料含有液、
 1 2 …試料台、
 1 3 …スライドガラス、

- 1 4 …蓋、
 1 5 …対物レンズ、
 1 6 …レーザー発生装置。

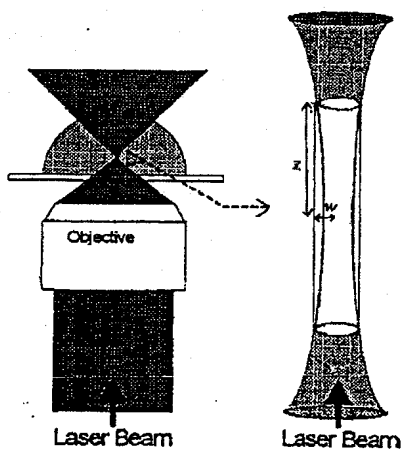
【図 1】



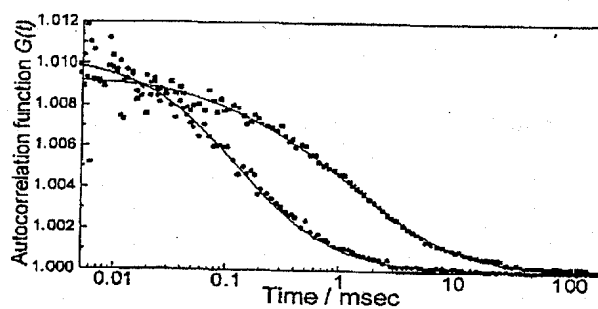
【図 2】



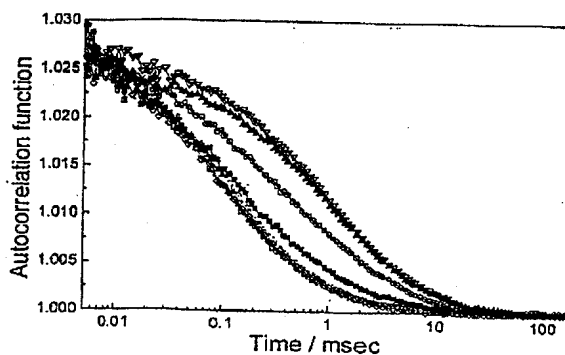
【図 3】



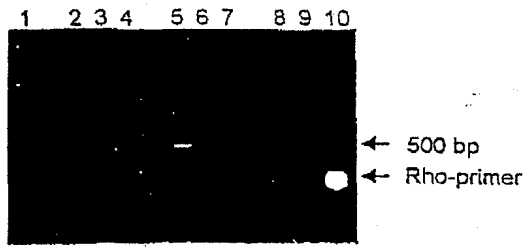
【図 4】



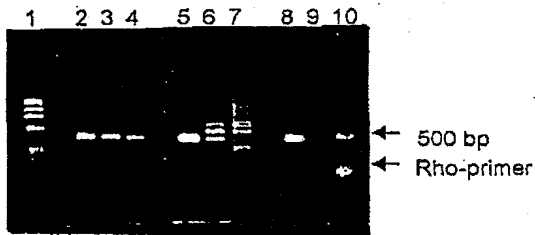
【図 6】



【図5】

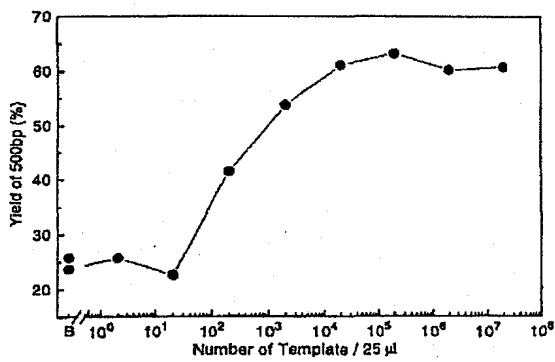


(A)

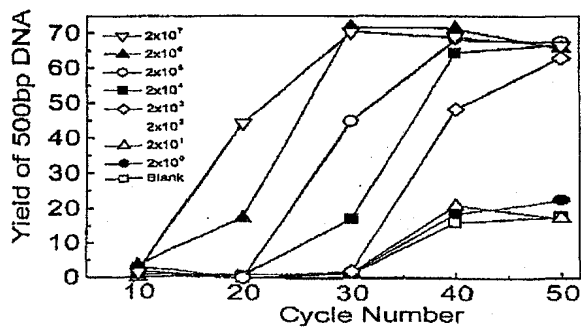


(B)

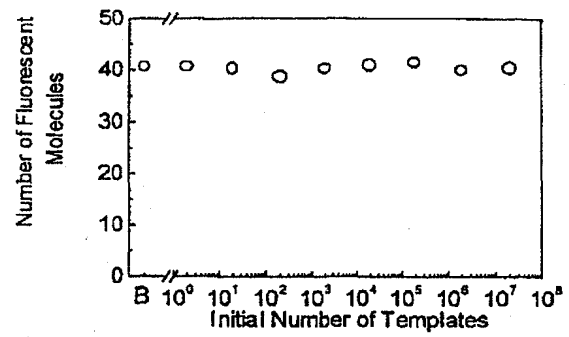
【図8】



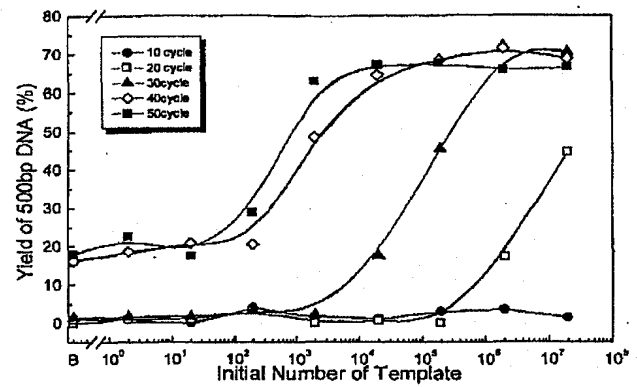
【図10】



【図7】



【図9】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 FA11
FB01 FB02 FB07 FB13 GC15
JA01
4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 CA20
HA13 HA14
4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR32
QR38 QR42 QR62 QS25 QS34
QS39 QX02 QX10